

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
20. September 2001 (20.09.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/68811 A2**

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 5/06, 5/08, 5/02, A61K 35/32, A61P 19/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/02698
- (22) Internationales Anmeldedatum: 9. März 2001 (09.03.2001)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 100 13 223.5 13. März 2000 (13.03.2000) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **CO.DON AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE]; Warthestrasse 21, 14513 Teltow (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **LIBERA, Jeanette** [DE/DE]; Bartherstrasse 56, 13051 Berlin (DE). **ANDERER, Ursula** [DE/DE]; Wehrmathen 78, 12529 Berlin (DE). **FRITSCH, Karl-Gerd** [DE/DE]; Brummerstrasse 38a, 14195 Berlin (DE). **JOSIMOVIC-ALASEVIC, Olivera** [DE/DE]; Uhlandstrasse 67, 10717 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:**  
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR IN VITRO PRODUCTION OF THREE-DIMENSIONAL VITAL CARTILAGE OR BONE TISSUE AND USE THEREOF AS TRANSPLANT MATERIAL

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR IN VITRO-HERSTELLUNG VON DREIDIMENSIONALEM, VITALEM KNORPEL- ODER KNOCHENGeweBE UND DESSEN VERWENDUNG ALS TRANSPLANTATIONSMATERIAL

(57) Abstract: The invention relates to an extremely simply method for in vitro production of three-dimensional, vital and mechanically stable cartilage or bone tissue and to the use thereof as transplant material in the treatment of cartilage or bone defects and degenerative diseases such as rheumatism or arthrosis, in addition to the use thereof in testing active substances and physical factors. The object of the invention is also cartilage or bone tissue thus produced and therapeutic preparations e.g. injection solutions containing said tissue.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein äußerst einfaches Verfahren zur in vitro-Herstellung von dreidimensionalem, vitalem und mechanisch stabilem Knorpel- oder Knochengewebe und dessen Verwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von Knorpel- oder Knochendefekten und von degenerativen Erkrankungen, wie z.B. Rheuma oder Arthrose sowie dessen Verwendung zur Testung von Wirkstoffen und physikalischen Faktoren. Gegenstand der Erfindung sind auch das hergestellte Knorpel- oder Knochengewebe und therapeutische Zubereitungen, z.B. Injektionslösungen, die dieses Gewebe beinhalten.



WO 01/68811 A2

5

10

---

**Verfahren zur in vitro-Herstellung von dreidimensionalem,  
vitalem Knorpel- oder Knochengewebe und dessen Verwendung  
als Transplantationsmaterial**

---

15

**Beschreibung**

20

25

30

Die Erfindung betrifft ein äußerst einfaches Verfahren zur  
in vitro-Herstellung von dreidimensionalem, vitalem und  
mechanisch stabilem Knorpel- oder Knochengewebe und dessen  
Verwendung als Transplantationsmaterial zur Behandlung von  
Knorpel- oder Knochendefekten und von degenerativen  
Erkrankungen, wie z.B. Rheuma oder Arthrose sowie dessen  
Verwendung zur Testung von Wirkstoffen und physikalischen  
Faktoren. Gegenstand der Erfindung sind auch das  
hergestellte Knorpel- oder Knochengewebe und therapeutische  
Zubereitungen, z.B. Injektionslösungen, die dieses Gewebe  
beinhalten. Erfindungsgemäß können die verschiedensten  
Knorpel- und Knochengewebe hergestellt werden, so z.B.  
hyaline, elastische, Faser- oder Bindegewebsknorpel wie  
beispielsweise Gelenksknorpel, Nasenknorpel,  
Meniskusknorpel oder Bandscheibenknorpel.

35

Auf dem Gebiet des Tissue Engineering wird seit längerem  
nach Lösungen zum Aufbau körpereigenen Gewebes gesucht.  
Dazu werden zum einen körpereigene Zellen mit und ohne  
Trägermaterial verwendet und zum anderen ausschließlich

5       Trägermaterialien in den Defekt eingebracht, wobei je nach  
Indikation resorbierbare oder nicht resorbierbare Materialien verwendet werden können.

10       Bei der Verwendung von Trägermaterialien ist nachteilig,  
daß deren Abbauprodukte andere Gewebe schädigen können und  
daß bei Verwendung von nicht autogenen, also nicht patienteneigenen Trägermaterialien Immunreaktionen oder Infektionen mit tierischen oder menschlichen Erregern auftreten können.

15       Eine bekannte Methode unter Verwendung von körpereigenen Zellen ist die Knorpel- und Knochenzelltransplantation, die zur Behandlung von Knorpel- und Knochendefekten angewandt wird. Dabei wird das Potential der Knorpel- und Knochenzellen genutzt, um *in vivo* neues Gewebe aufzubauen.  
20       So werden beispielsweise dem Patienten Knorpel- oder Knochenbiopsien entnommen, daraus Knorpel- oder Knochenzellen isoliert, mittels Zellkultivierung vermehrt und anschließend dem Patienten die Zellen im Bereich des Gewebedefektes, z.B. durch Einspritzen, transplantiert.  
25       Dort bilden sie neues Gewebe und füllen somit den Defekt vollständig auf.

30       Durch die genannten Verfahren wird erreicht, daß nach Applikation der Zelltransplantate oder Einbringen der Trägermaterialien im Körper Gewebe aufgebaut wird.

35       Ein weiteres Ziel im Tissue Engineering besteht jedoch darin, körpereigenes Gewebe bereits *in vitro* vorzufertigen. Dazu sind aus der Literatur eine Vielzahl von Verfahren bekannt (vgl. DE 195 40 487, WO 97/46665, DE 197 52 900,

5 US 5.932.459), die entweder spezielle Vorrichtungen oder  
Träger benötigen, viele Verfahrensschritte beinhalten oder  
die Zugabe von wachstumsfördernden Verbindungen, die  
Fremdstoffe für den Körper darstellen, erforderlich machen.  
Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, ein  
10 möglichst einfaches Verfahren zur Herstellung von typischem  
Knorpel- oder Knochengewebe bereitzustellen, mit dem  
vitales, dreidimensionales und mechanisch stabiles Gewebe  
hergestellt werden kann, das zur Transplantation geeignet  
ist und ein schnelles Anwachsen im Körper bzw. ein  
15 schnelles Auffüllen des Knorpel- oder Knochendefektes  
gewährleistet. Außerdem soll das in vitro hergestellte  
Gewebe möglichst keine immunologischen Reaktionen im  
Organismus, der das Transplantat erhält, auslösen.

20 Es wurde überraschender Weise gefunden, daß diese Aufgabe  
mit dem in Anspruch 1 angegebenen, einfachen Verfahren  
gelöst werden kann.

Erfindungsgemäß werden als Ausgangsmaterial patienteneigene  
25 Gewebebiopsien oder -proben oder mesenchymale Stammzellen,  
z.B. aus dem peripheren Blut oder Knochenmark verwendet.  
Aus den Biopsien werden die gewebeaufbauenden Zellen  
mittels enzymatischem Verdau des Gewebes, durch Auswandern  
oder durch Reagenzien, die Zielzellen erkennen, mit  
30 üblichen Methoden isoliert. Diese Zellen werden dann  
erfindungsgemäß in einfacher Weise mit üblichem  
Kulturmedium in Zellkulturgefäßen mit hydrophober Ober-  
fläche und sich verjüngendem Boden in Suspension so lange  
stationär kultiviert, bis ein dreidimensionales Zell-  
35 aggregat entsteht, das zu mindestens 40 Volumen%, vorzugs-

weise mindestens 60 Volumen% bis maximal 95 Volumen%,  
extrazelluläre Matrix (ECM) beinhaltet, in welche  
differenzierte Zellen eingebettet sind. Das entstandene  
Zellaggregat weist einen äußeren Bereich auf, in welchem  
proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden sind.  
Diesen Aufbau der erfindungsgemäß erhaltenen Zellaggregate  
verdeutlichen die mikroskopischen Aufnahmen in Abb. 1 und  
1a, wobei Abb. 1 die Ausschnittsvergrößerung des Quer-  
schnittes eines erfindungsgemäßen Zellaggregates mit vP als  
Zone des Auftretens der ersten gewebespezifischen  
Matrixproteine und M als Zone der Bildung von  
gewebespezifischen Matrixproteinen darstellt, und Abb. 1a  
das gesamte Zellaggregat mit der äußeren Zone  
proliferationsfähiger und migrationsfähiger Zellen P (Zone  
der Expression des Proteins S 100) zeigt.

Es ist erstaunlich, daß alle Zellen, die in den nach dieser  
Erfindung hergestellten Sphäroiden integriert sind,  
überleben und auch nach fortschreitender Kultivierungsdauer  
die Zellen im Inneren nicht absterben. Mit fortschreitender  
Kultivierungsdauer differenzieren die Zellen im Inneren der  
Aggregate aus und es bilden sich Sphäroide, die aus ECM,  
differenzierten Zellen und einer Proliferationszone am Rand  
bestehen. Der Prozeß der Bildung dieser gewebespezifischen  
Matrix mit eingebetteten Zellen ist dem Prozeß der Gewebs-  
entstehung bzw. -neubildung und -umbildung im Körper sehr  
ähnlich. Während der Differenzierung in Zellkultur wird der  
Abstand der aggregierten Zellen durch Bildung der  
gewebespezifischen Matrix immer größer. Es entsteht im  
Inneren der Sphäroide eine Gewebehistologie, die dem  
natürlichen Gewebe sehr ähnlich ist. Die Versorgung der

5 Zellen im Inneren der Sphäroide erfolgt, wie im natürlichen Knorpel auch, allein durch die Diffusion der Nährstoffe. Während der weiteren Herstellung der Sphäroide bildet sich die Zone proliferationsfähiger und migrationsfähiger Zellen am Rand der Sphäroide. Diese Zone hat den unschätzbaren  
10 Vorteil, daß nach Einbringen der Sphäroide in Defekte, die in dieser Randzone befindlichen Zellen in der Lage sind, auszuwandern und aktiv den Kontakt zum umliegenden Gewebe herzustellen bzw. eine Integration des in vitro gebildeten Gewebes in seine Umgebung ermöglichen. Damit sind die  
15 hergestellten gewebespezifischen Zellaggregate hervorragend zur Behandlung von Gewebedefekten und zum Neuaufbau von Gewebe *in vitro* und *in vivo* geeignet.

In Abhängigkeit von der Größe des zu behandelnden Gewebedefektes kann es von Vorteil sein, bereits größere Gewebestücke zu transplantieren, um ein schnelleres Auffüllen des Defektes zu erreichen. Für diesen Fall werden  
20 mindestens zwei, besser aber mehr der erhaltenen Zellaggregate fusioniert, indem sie gemeinsam unter den gleichen Bedingungen und in den gleichen Kulturgefäßen wie  
25 oben beschrieben bis zur gewünschten Größe weiterkultiviert werden.

Abb. 1b zeigt zwei zu fusionierende Sphäroide nach einem  
30 Tag.

Abb. 1c zeigt, daß bereits einige Stunden später die Grenze zwischen den beiden Sphäroiden nicht mehr zu erkennen ist. Nach einer weiteren Woche sind die Sphäroide vollständig fusioniert und es ist ein größeres in vitro Gewebestück  
35 entstanden (Abb. 1d). Der Aufbau der so erhaltenen größeren

5        Zellaggregate ist mit dem der zunächst erhaltenen Sphäroide  
identisch. Sie können bis zu maximal 95% ECM beinhalten und  
alle im erhaltenen Gewebestück enthaltenen Zellen sind  
vital.

10       Das erhaltene Knorpel- oder Knochengewebe ist außeror-  
dentlich stabil. Die Zellaggregate können auf  $\frac{1}{4}$  ihres  
Durchmessers komprimiert werden, ohne daß sie zerbrechen  
oder beispielsweise beim Injizieren in den Körper mittels  
15       einer Kanüle auseinanderfallen. Es ist möglich, diese  
Gewebestückchen mit einer Pinzette oder einer Pipette aus  
dem Zellkulturgefäß zu entnehmen.

Um ausreichend Knorpel- oder Knochenzellen für die  
erfindungsgemäße Suspensionskultivierung zur Verfügung zu  
20       haben, werden die vom Patienten gewonnenen Zellen in einer  
vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung zunächst in an  
sich bekannter Art und Weise in Monolayerkultur vermehrt.  
Die Passage der Zellen in Monolayerkultur wird so gering  
wie möglich gehalten. Nach Erreichen des konfluenten  
25       Stadiums werden die in Monolayer gewachsenen Zellen  
geerntet und gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens in  
Suspension, wie oben beschrieben, kultiviert.

Als Zellkulturmedium kann sowohl für die Suspensions- als  
30       auch für die Monolayerkultur übliches Medium, z. B.  
Dulbecco's MEM, unter Zusatz von Serum, verwendet werden.  
Vorzugsweise wird DMEM und Hams im Verhältnis 1:1  
eingesetzt. Um jedoch immunologische Reaktionen des  
Patienten auf das in vitro hergestellte Gewebe zu  
35       vermeiden, wird als Serum vorzugsweise autogenes Serum des

5 Patienten eingesetzt. Es ist auch möglich xenogenes oder  
allogenes Serum zu verwenden.

Dem Kulturmedium werden erfindungsgemäß keine Antibiotika,  
Fungistatika oder andere Hilfsstoffe zugesetzt. Es hat sich  
10 gezeigt, daß nur die autogene, xenogene oder allogene  
Kultivierung der Zellen und Zellaggregate sowie die Kultivierung  
ohne Antibiotika und Fungistatika eine unbeeinflusste Morphologie  
sowie Differenzierung der Zellen in der Monolayerkultur und eine  
15 ungestörte Bildung der spezifischen Matrix in den Zellaggregaten ermöglicht. Weiterhin  
sind durch den Verzicht sämtlicher Zusatzstoffe während der  
Herstellung nach Einbringen des in vitro hergestellten Gewebes  
in den menschlichen und auch tierischen Organismus sämtliche  
immunologische Reaktionen ausgeschlossen.

20 Es ist allerdings überraschend, daß weder bei der Suspensionskultivierung,  
noch bei der Monolayerkultivierung Wachstumsfaktoren oder andere  
wachstumsfördernde Zusätze notwendig sind. Trotz des Fehlens dieser  
Zusätze werden bereits nach zweitägiger erfindungsgemäßer Suspensionskultivierung  
25 dreidimensionale Zellaggregate mit gewebespezifischen Eigenschaften erhalten.  
Die Größe hängt natürlich von der eingebrachten Zellzahl pro Volumen Kulturmedium ab.  
Werden beispielsweise  $1 \times 10^7$  Zellen in 300 µl Kulturmedium  
30 eingebracht, so entstehen innerhalb von 1 Woche dreidimensionale  
Sphäroide von ca. 500-700 µm Durchmesser. Für einen 1 cm<sup>2</sup>-Gewebedefekt  
müßten ca. 100 solcher Sphäroide transplantiert, z. B. injiziert, werden.  
Die andere Möglichkeit ist die in vitro-Fusion der kleinen Zellaggregate  
35 zu größeren - wie oben beschrieben - und das Einbringen



5 dieser in den Defekt. Vorzugsweise werden erfindungsgemäß  
zwischen  $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^7$  Zellen in 300  $\mu$ l Kulturmedium  
zur Herstellung der kleinen Zellaggregate verwendet,  
besonders bevorzugt  $1 \times 10^5$  Zellen. Die nach einigen Tagen  
gebildeten Sphäroide werden dann für mindestens 2-4 Wochen  
10 in Abhängigkeit von der Zellart und den patienten-  
spezifischen Charakteristika in dem geeigneten Kulturmedium  
kultiviert, um die Ausbildung der gewebespezifischen Matrix  
zu induzieren. Im besonderen Falle können dann einzelne  
Sphäroide ab ca. einer Woche Kultivierung fusioniert  
15 werden, um die Größe des Gewebestückes zu erhöhen.

Als Zellkulturgefäße müssen für die erfindungsgemäße  
Kultivierung in Suspension solche mit hydrophober, also  
adhäsionsverhindernder Oberfläche, wie z. B. Polystyrol  
20 oder Teflon, eingesetzt werden. Zellkulturgefäße mit  
nichthydrophober Oberfläche können durch Beschichten mit  
Agar oder Agarose hydrophobiert werden. Weitere Zusätze  
sind nicht erforderlich. Vorzugsweise dienen als Zellkul-  
turgefäße Napfplatten. Dabei können für die Herstellung der  
25 kleinen Zellaggregate beispielsweise 96-Napfplatten und für  
die Herstellung der fusionierten Aggregate 24-Napfplatten  
Verwendung finden.

Erfindungsgemäß müssen die Zellkulturgefäße einen sich  
30 verjüngenden, vorzugsweise gewölbten Boden aufweisen. Es  
hat sich gezeigt, daß sich das erfindungsgemäße Gewebe in  
Gefäßen mit flachem Boden nicht bildet. Offensichtlich  
dient die Vertiefung zum Finden der Zellen.

5 Gegenstand der Erfindung ist auch das nach dem oben  
beschriebenen Verfahren hergestellte Knorpel- oder  
Knochengewebe, das als autogenes, xenogenes oder allogenes  
Transplantationsmaterial zur Behandlung von Knorpel- oder  
Knochendefekten und von degenerativen Erkrankungen wie z.  
10 B. Arthrose oder Rheuma Verwendung finden kann. Dazu werden  
die erfindungsgemäßen in vitro hergestellten Zellaggregate  
mittels Injektion in das erkrankte oder abgebaute Gewebe  
eingespritzt. Dazu muß die Injektionsnadel oder ein anderes  
geeignetes Applikationssystem mindestens den Durchmesser  
15 der Sphäroide haben. Die Zellen in der Zone  
proliferationsfähiger und migrationsfähiger Zellen am Rande  
der Sphäroide wachsen schnell in das umliegende Gewebe ein  
und ermöglichen eine schnelle Einbindung des in vitro  
hergestellten Gewebes und stellen ein Potential zur  
20 Neubildung von Gewebe in der Umgebung der Sphäroide dar, da  
diese Zellen noch proliferieren und Matrix bilden. Diese  
Behandlung kann im Fortschritt zu bisherigen Verfahren im  
Tissue Engineering arthroskopisch erfolgen.

25 Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch therapeutische  
Zubereitungen, die das erfindungsgemäße Knorpel- oder  
Knochengewebe umfassen, z. B. Injektionslösungen.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung des  
30 erfindungsgemäßen Knorpel- oder Knochengewebes zur Testung  
verschiedener Faktoren, wie z.B. Wirkstoffen und  
physikalischen Faktoren, die z. B. die Bildung und  
Differenzierung von Matrix und Zellen beeinflussen, wobei  
die physikalischen Faktoren z.B. Druck oder elektrische  
35 Felder sein können. Dazu werden die Zellsphäroide

5       erfindungsgemäß hergestellt und in unterschiedlichen  
Reifestadien werden die zu testenden Medikamente  
hinzugegeben und unterschiedlichste Parameter der  
Sphäroidentstehung und -reifung charakterisiert. Diese  
Tests sind im Vergleich zu den herkömmlichen Medika-  
10       mententests an Tieren oder Tumorsystemen durch die  
Verwendung von nur autologem Material sehr patienten-  
spezifisch und ermöglichen eine individuelle Diagnose.

Nachfolgend soll die Erfindung an Ausführungsbeispielen  
15       näher erklärt werden, ohne sie darauf einzuschränken.

#### Ausführungsbeispiele

##### Beispiel 1: in vitro-Herstellung von Knorpelgewebe

20       Vom Patienten wird aus einem Bereich hyalinen, gesunden  
Knorpels eine Biopsie entnommen. Aus dieser Biopsie werden  
mittels enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit  
25       Kollagenaselösung die Chondrozyten isoliert. Nach Trennung  
der isolierten Zellen vom unverdauten Knorpelgewebe, werden  
diese in Zellkulturflaschen überführt und unter Zugabe von  
DMEM / Hams F12 Kulturmedium (1/1) und 10% autologem Serum  
des Patienten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zweimal  
30       wöchentlich wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach  
Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zellschicht mit  
physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels  
Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer  
weiteren Waschung werden 1 x 10<sup>5</sup> Zellen in je ein  
35       Zellkulturgefäß überführt, das mit Agarose beschichtet ist.  
Nach einem Tag haben sich die ersten Zellen in Aggregaten

5       angeordnet. Diese Aggregate werden alle 2 Tage mit frischem Medium versorgt und für mindestens 2 Wochen kultiviert.

Bereits nach einer Woche wurden Kollagen Typ II und Proteoglycane in den Aggregaten nachgewiesen. Dazu wurde ein spezifischer Antikörper gegen Kollagen Typ II  
10       verwendet. Der an Kollagen Typ II gebundene Primärantikörper wurde mit Hilfe eines Zweitantikörpers und daran gekoppeltem ABC- System nachgewiesen. Das heißt, an dem 2. Antikörper ist über Avidin- Biotin das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt, welches das Substrat  
15       Fuchsin umsetzt, wobei ein roter Farbstoff entsteht.

Die Proteoglycane wurden mittels Goldnerfärbung nachgewiesen. Kollagen Typ II und Proteoglykane sind Bestandteile der Knorpelmatrix *in vivo* und stellen die wichtigsten Strukturproteine dar, die für die Funktion des Knorpels von  
20       entscheidender Bedeutung sind.

In der äußeren Schicht der Aggregate wurde zum gleichen Zeitpunkt das für Knorpelzellen spezifische Protein S 100 nachgewiesen. S 100 wird nicht in Knochengewebe und  
25       Bindegewebe exprimiert. Nur diese Gewebe könnten hierbei auch entstehen. Somit wurde eindeutig nachgewiesen, daß das entwickelte Gewebe Knorpelgewebe ist.

Nach 1-2 Wochen Kultivierung liegen die Zellen noch dicht beieinander. Mit steigender Kultivierungsdauer nimmt der  
30       Anteil an extrazellulärer Matrix zu und der Anteil an Zellen ab. Nach einer Woche ist mindestens 40% ECM nachweisbar und nach 3 Wochen wurde bereits ca. 60% ECM entwickelt. Nach 3 Monaten Kultivierung der Knorpelgewebe ist der Anteil an ECM auf 80-90% angestiegen. Das heißt, im  
35       Inneren der hergestellten Aggregate wurde knorpelartiges

5 Gewebe aufgebaut, welches im Aufbau dem *in vivo* Knorpel entspricht und auch die Funktion von Knorpelgewebe übernehmen kann.

#### 10 Beispiel 2: Transplantation von Knorpelgewebe

Das in Beispiel 1 hergestellte Gewebe (ca. 200 Sphäroide aus je  $1 \cdot 10^5$  Zellen) wurde in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und in einen ca.  $1 \text{ cm}^2$  großen, mit Periost abgedeckten Knorpeldefekt des Probanden eingespritzt. Es wurde festgestellt, daß der Knorpeldefekt bereits innerhalb von 1 bis 2 Monaten mit Knorpelgewebe aufgefüllt ist, während durch die bisherige Transplantation von jungen, lediglich *in vitro* vermehrten Knorpelzellen die Auffüllung eines Defektes einer solchen Größe erst nach 6-12 Monaten zu verzeichnen ist. Das erfindungsgemäße *in vitro* hergestellte Knorpelgewebe gewährleistet also neben der Erfüllung der mechanischen Funktion des hergestellten Gewebes die rasche Integration der hergestellten Gewebestücke durch die proliferationsfähigen und migrationsfähigen Zellen in der äußeren Schicht der Aggregate. Somit erlaubt die Struktur und Funktion der Gewebestücke auch die schnelle Reparatur von Defekten und degeneriertem Knorpelgewebe.

#### 30 Beispiel 3: *in vitro*-Herstellung von Knochengewebe

Vom Patienten wird eine Knochenbiopsie aus dem Bereich des Spongiosaknochens entnommen. Aus dieser Biopsie werden mittels enzymatischen Verdaus durch Inkubation mit Kollagenaselösung die Osteoblasten isoliert. Nach Trennung

5 der isolierten Zellen vom unverdauten Knochengewebe, werden diese in Zellkulturflaschen überführt und unter Zugabe von DMEM / Hams F12 Kulturmedium (1/1) und 10% autologem Serum des Patienten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zweimal wöchentlich wird ein Mediumwechsel vorgenommen. Nach  
10 Erreichen des konfluenten Stadiums wird die Zellschicht mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturoberfläche geerntet. Nach einer weiteren Waschung werden  $1 \times 10^5$  Zellen in je ein Zellkulturgefäß überführt, das mit Agarose beschichtet ist.  
15 Nach einem Tag haben sich die ersten Zellen in Aggregaten angeordnet. Diese Aggregate werden alle 2 Tage mit frischem Medium versorgt und für mindestens 2 Wochen kultiviert.

Bereits nach einer Woche wurden Kollagen Typ I und  
20 Proteoglycane in den Aggregaten nachgewiesen. Dazu wurde ein spezifischer Antikörper gegen Kollagen Typ I verwendet. Durch den Nachweis von Kollagen I wurde zweifelsfrei nachgewiesen, daß es sich nicht um Knorpelgewebe handelt. Der an Kollagen Typ I gebundene Primärantikörper wurde mit  
25 Hilfe eines Zweitantikörpers und daran gekoppeltem ABC-System nachgewiesen. Das heißt, an dem 2. Antikörper ist über Avidin- Biotin das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt, welches das Substrat Fuchsin umsetzt, wobei ein roter Farbstoff entsteht.

30 Die Proteoglycane wurden wie in Beispiel 1 mittels Goldnerfärbung nachgewiesen. Kollagen Typ I und Proteoglykane sind Bestandteile der Knochenmatrix *in vivo* und stellen die wichtigsten Strukturproteine dar, die für

5 die Funktion des Knochens von entscheidender Bedeutung sind.

In der äußeren Schicht der Aggregate wurde zum gleichen Zeitpunkt proliferationsfähige Knochenzellen nachgewiesen.

10

Nach 2 Wochen Kultivierung liegen die Zellen noch dicht beieinander. Mit steigender Kultivierungsdauer nimmt der Anteil an extrazellulärer Matrix zu und der Anteil an Zellen ab. Nach einer Woche ist mindestens 40% ECM nachweisbar und nach 3 Wochen wurde bereits ca. 60% ECM entwickelt. Das heißt, im Inneren der hergestellten Aggregate wurde knochenartiges Gewebe aufgebaut, welches in der Zusammensetzung dem *in vivo* Knochen entspricht und auch die Funktion von Knochengewebe übernehmen kann.

20

#### Beispiel 4: Transplantation von Knochengewebe

Die in Beispiel 3 hergestellten Gewebe (ca. 50 Stück) werden in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und in den Bereich einer schwer heilenden Knochenfraktur gespritzt. Es wurde festgestellt, daß der Prozeß der Knochenheilung induziert werden konnte und bereits nach 3 Wochen neues Knochengewebe gebildet wurde, während bei ausbleibender Behandlung des Defektes eine Bruchheilung erst nach Monaten erfolgt wäre. Das *in vitro* gezüchtete Knochengewebe gewährleistet also die schnelle Integration des Gewebes in das umliegende Gewebe und die Auffüllung von Knochendefekten. Somit erlaubt die Struktur und Funktion der Gewebestücke die Heilung von Knochendefekten, die Induktion der Osteosynthese und die Behandlung von degenerativen Knochenerkrankungen.

5

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur in vitro-Herstellung von dreidi-  
10 mensionalem, vitalem Knorpel- oder Knochengewebe,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
aus einem menschlichen oder tierischen Organismus  
Knorpelzellen, Knochenzellen, oder mesenchymale Stamm-  
zellen gewonnen werden und diese in Zellkulturgefäßen  
15 mit hydrophober Oberfläche und sich verjüngendem Boden  
als Suspensionskultur stationär so lange kultiviert  
werden bis ein Zellaggregat entsteht, das zu mindestens  
40 Vol.% extrazelluläre Matrix (ECM) beinhaltet, in  
welche differenzierte Zellen eingebettet sind, und das  
20 einen äußeren Bereich aufweist, in welchem  
proliferations- und migrationsfähige Zellen vorhanden  
sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1,  
25 dadurch gekennzeichnet, daß  
die aus dem Explantat gewonnenen Knorpel- oder  
Knochenzellen zunächst in Monolayerkultur vermehrt  
werden und anschließend die Kultivierung in Suspension  
gemäß Anspruch 1 vorgenommen wird.

30

3. Verfahren nach Anspruch 1,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
je nach gewünschter Gewebegröße mindestens zwei der  
entstandenen Zellaggregate fusioniert werden, indem sie  
35 gemeinsam in Zellkulturgefäßen mit hydrophober



- 5           Oberfläche und sich verjüngendem Boden in Suspension  
weiterkultiviert werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
10           als Zellkulturgefäße Napfplatten eingesetzt werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
Zellkulturgefäße mit nichthydrophober Oberfläche durch  
15           Beschichten mit Agar oder Agarose hydrophobiert werden.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
die Kultivierung ohne den Zusatz von wachstumsfördernden  
20           Verbindungen durchgeführt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
das Kulturmedium autogenes, xenogenes oder allogenese  
25           Serum enthält.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7,  
dadurch gekennzeichnet, daß  
die Kultivierung in Suspensionskultur so lange  
30           durchgeführt wird, bis das erhaltene Zellaggregat  
mindestens 60% ECM aufweist.
9. Knorpel- oder Knochengewebe hergestellt nach den  
Ansprüchen 1 bis 8.

- 5        10. Verwendung von Knorpel- oder Knochengewebe gemäß  
Anspruch 9 als autogenes, xenogenes oder allogen  
Transplantationsmaterial zur Behandlung von Knorpel-  
oder Knochendefekten und von degenerativen  
Erkrankungen.
- 10       11. Verwendung nach Anspruch 10 zur Behandlung von  
Arthrose und Rheuma.
- 15       12. Verwendung von Knorpel- oder Knochengewebe gemäß  
Anspruch 9 zur Testung von Wirkstoffen und Faktoren,  
die die Bildung und Differenzierung von Matrix und  
Zellen beeinflussen.
- 20       13. Therapeutische Zubereitung umfassend Knorpel- oder  
Knochengewebe gemäß Anspruch 9.

1/5

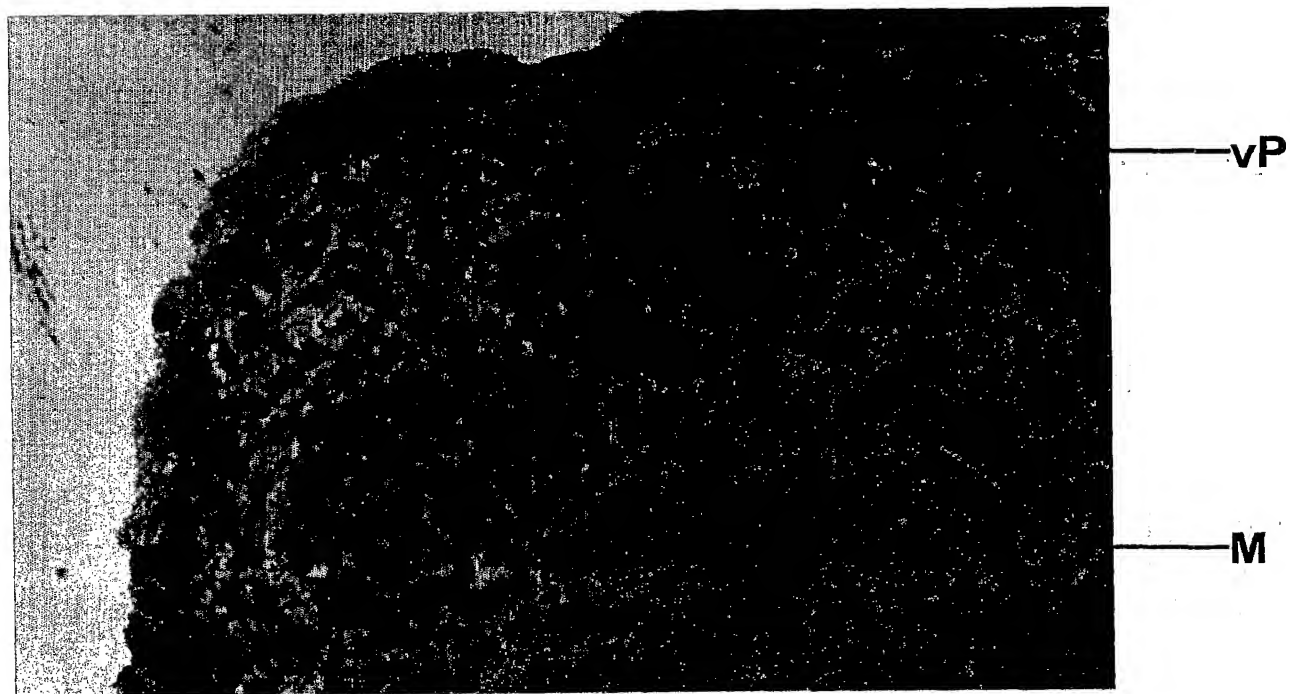
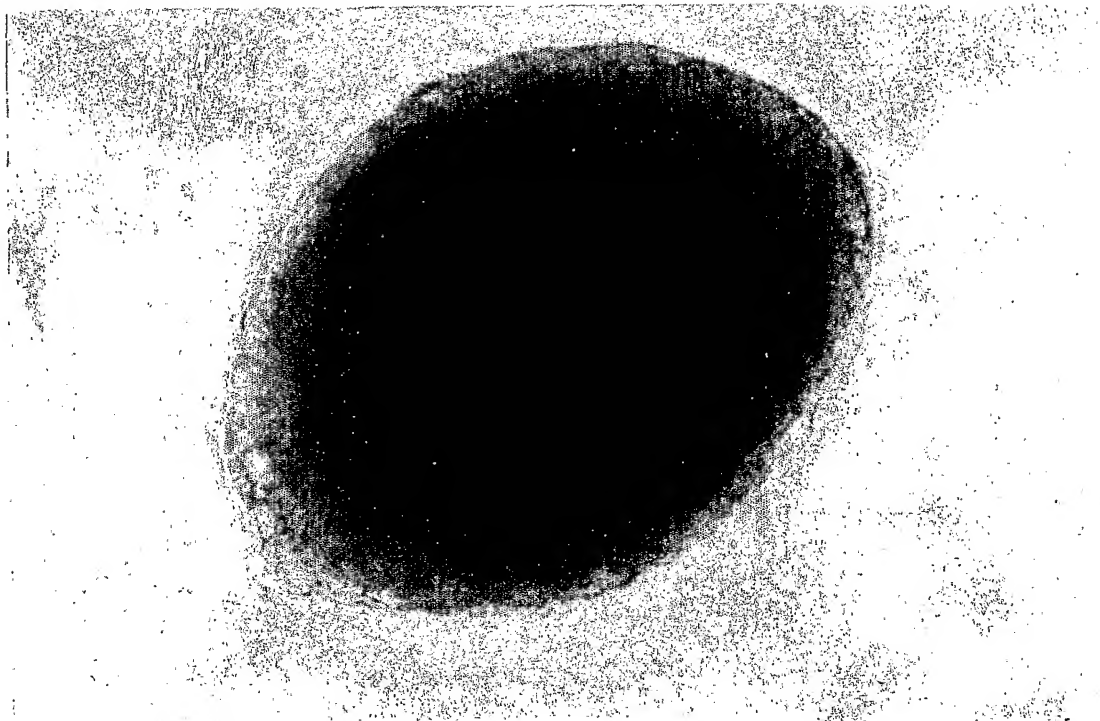


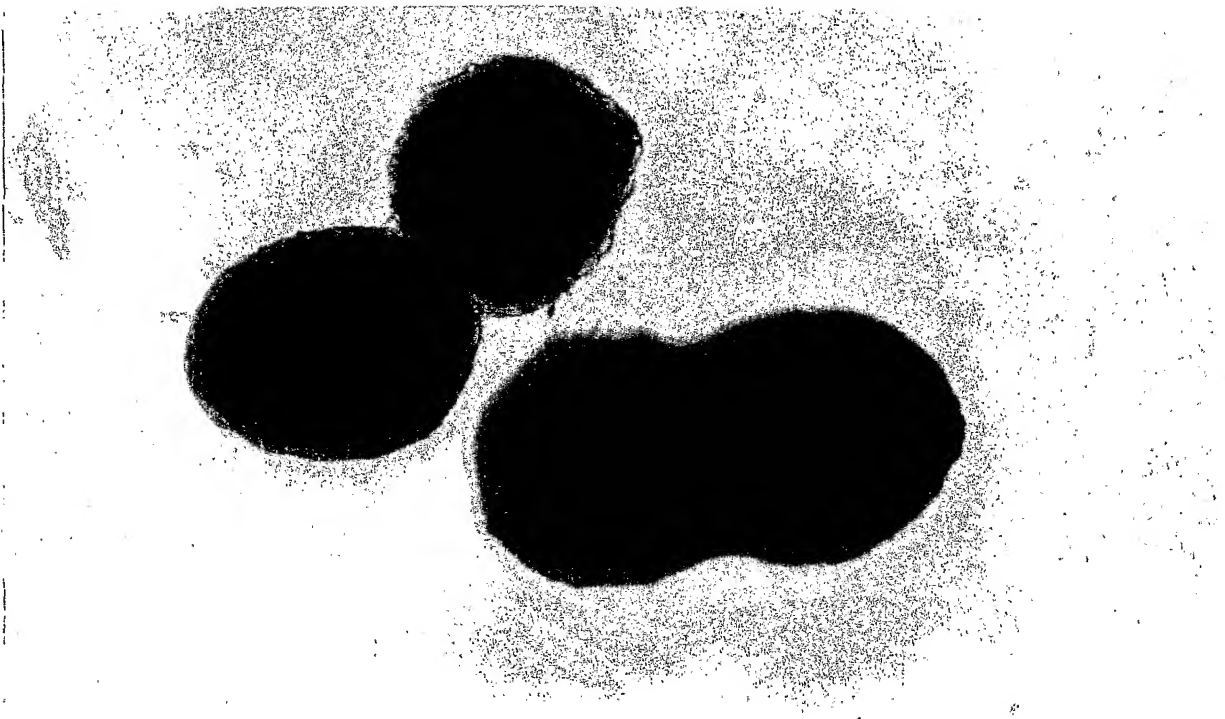
Fig . 1

**2/5**



**Fig. 1a**

**3/5**



**Fig . 1b**

**4/5**

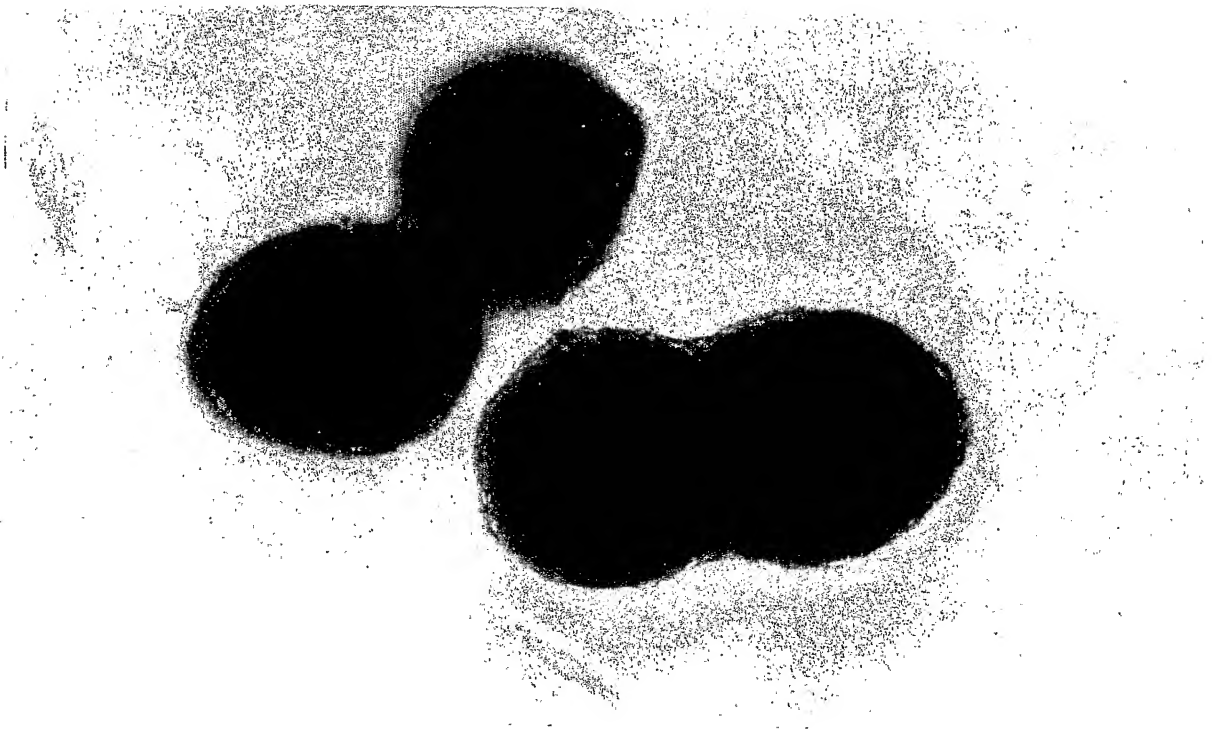
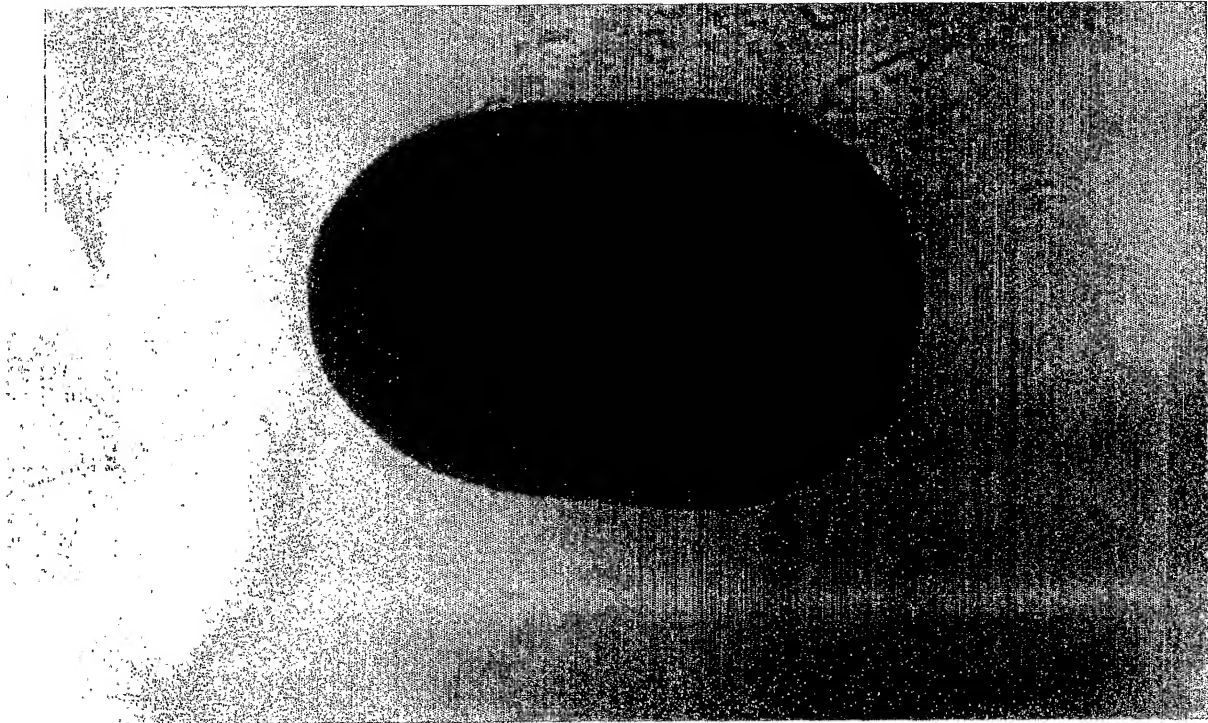


Fig. **1c**

**5/5**



**Fig. 1d**